

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
22 novembre 2001 (22.11.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/88019 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C08G 81/00, C08B 37/00, C08J 3/12, A61K  
9/14, 9/50, 9/51, 31/715, G01N 33/48

(74) Mandataires : JACOBSON, Claude etc.; Cabinet  
Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex  
09 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/01496

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international : 16 mai 2001 (16.05.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
00/06232 16 mai 2000 (16.05.2000) FR

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-  
ENTIFIQUE (C.N.R.S) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange,  
F-75016 Paris (FR).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : GREF,  
Ruxandra [FR/FR]; 90, Anatole France, F-92290 Chate-  
nay Malabry (FR). PONCHEL, Gilles [FR/FR]; 46, rue  
de Fécamp, F-75012 Paris (FR). DUCHENE, Dominique  
[FR/FR]; 8 bis, rue Laurent-Pichat, F-75116 Paris (FR).  
COUVREUR, Patrick [FR/FR]; 1 bis, rue du Lac Léman,  
F-91140 Villebon-sur-Yvette (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: MATERIAL BASED ON BIODEGRADABLE POLYMERS AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) Titre : MATERIAU A BASE DE POLYMERES BIODEGRADABLES ET SON PROCEDE DE PREPARATION

(57) Abstract: The invention concerns a material with controlled chemical structure consisting of at least a biodegradable polymer material and a polysaccharide with linear, branched or crosslinked skeleton. The invention is characterised in that it is obtained by controlled functionalizing of at least a molecule of said biodegradable polymer or one of its derivatives by covalent grafting directly at its polymeric structure, of at least a molecule of said polysaccharide. The invention also concern a vector preferably in the form of particles obtained from said material and its use as biological vector.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un matériau à structure chimique contrôlée composé d'au moins un polymère biodégradable et d'un polysaccharide à squelette linéaire, ramifié ou réticulé, caractérisé en ce qu'il dérive de la fonctionnalisation contrôlée d'au moins une molécule dudit polymère biodégradable ou d'un de ses dérivés par greffage covalent directement au niveau de sa structure polymérique, d'au moins une molécule dudit polysaccharide. Elle vise également un vecteur de préférence sous forme de particules obtenu à partir de ce matériau ainsi que son utilisation à titre de vecteur biologique.

BEST AVAILABLE COPY

WO 01/88019 A1

MATERIAU A BASE DE POLYMERES BIODEGRADABLES ET SON PROCEDE DE  
PREPARATION.

La présente invention concerne de nouveaux matériaux à base de polymères biodégradables et de polysaccharides, des vecteurs dérivant de ces matériaux de préférence sous forme de particules, et leurs utilisations à titre de vecteurs biologiques pour des matières actives.

La vectorisation est une opération visant à moduler et si possible à totalement maîtriser la distribution d'une substance, en l'associant à un système approprié appelé vecteur.

Dans le domaine de la vectorisation, trois fonctions principales sont à assurer :

- Transporter la ou les matières actives dans les liquides biologiques de l'organisme,
- Acheminer les matières actives vers les organes à traiter, et
- Assurer la libération de ces matières actives.

Bien entendu, le principe général de la vectorisation est également de rendre la distribution de la matière active aussi indépendante que possible des propriétés de la substance active elle-même et de la soumettre à celle de vecteurs appropriés choisis en fonction de l'objectif envisagé.

En fait, le devenir in vivo du vecteur est conditionné par sa taille, ses caractéristiques physico-chimiques et, en particulier, ses propriétés de surface qui déterminent les interactions avec les composants du milieu vivant.

Parmi les différents vecteurs déjà existants, on peut distinguer plusieurs catégories.

Les vecteurs de première génération sont des systèmes conçus pour libérer un principe actif au sein de la cible visée. Il est nécessaire dans ce cas de faire appel à un mode d'administration particulier. Ces

vecteurs de taille relativement élevée (supérieure à quelques dizaines de microns) sont soit des systèmes pleins (microsphères), soit des systèmes creux (microcapsules), contenant une substance active, par exemple anticancéreuse, à l'état dissous ou dispersé dans le matériau constitutif de ces systèmes. Les matériaux utilisables sont de nature variable (cire, éthylcellulose, acide polylactique, copolymères des acides lactiques et glycolique) biodégradables ou non.

Les vecteurs de deuxième génération sont des vecteurs capables, sans mode d'administration particulier, de véhiculer un principe actif jusqu'à la cible visée. Plus précisément, il s'agit de vecteurs dont la taille est inférieure au micromètre et dont la distribution dans l'organisme est totalement fonction de leurs uniques propriétés physico-chimiques.

A cette seconde catégorie, appartiennent notamment les vecteurs vésiculaires de type liposomes qui sont des vecteurs constitués par une ou plusieurs cavités internes contenant une phase aqueuse, les nanocapsules qui sont des vecteurs vésiculaires formés d'une cavité huileuse entourée d'une paroi de nature polymérique, ainsi que les émulsions lipidiques. On distingue aussi les nanosphères qui sont constituées d'une matrice en polymère pouvant encapsuler des principes actifs. Couramment, on regroupe sous le terme « nanoparticules » les nanosphères ainsi que les nanocapsules. Les matières actives sont généralement incorporées au niveau des nanoparticules soit au cours du processus de polymérisation des monomères dont dérivent les nanoparticules, soit par adsorption à la surface des nanoparticules déjà formées, soit pendant la fabrication des particules à partir des polymères préformés.

La présente invention concerne tout particulièrement le domaine des vecteurs du type nano- et micro-particules et leurs applications.

Différents types de nano- et micro-particules sont déjà proposés dans la littérature. Conventionnellement, ils dérivent d'un matériau obtenu

par polymérisation directe de monomères (par exemple cyanoacrylates), par réticulation, ou encore ils sont élaborés à partir de polymères préformés : poly(acide lactique) (PLA), poly(acide glycolique) (PGA), poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), et leurs copolymères, comme par exemple le  
5 poly(acide lactique-co-acide glycolique) (PLGA), etc...

Plus récemment, un nouveau type de particules a été obtenu à partir d'un matériau dérivant de la polymérisation catalytique de monomères (comme par exemple lactide ou caprolactone), sur le squelette d'un polysaccharide.

10 Ce type de matériau présente toutefois l'inconvénient principal de ne pouvoir garantir une composition reproductible. En effet, toutes les fonctions hydroxyles présentes sur le squelette du polysaccharide considéré sont susceptibles d'amorcer la polymérisation des monomères. Il se forme ainsi sur le squelette un très grand nombre de chaînes de taille  
15 variable dérivant du monomère, qui « masquent » ce squelette. Ceci est un inconvénient majeur dans l'élaboration de vecteurs adaptés pour certaines applications (bioadhésion, « furtivité », ciblage,...) ou l'on recherche précisément à contrôler la nature du recouvrement des particules. En conséquence, par ce type de polymérisation, il est  
20 impossible d'obtenir une bonne reproductibilité de la synthèse, des échantillons homogènes, et de contrôler les degrés de polymérisation et de substitution, d'autant plus que la polymérisation se fait généralement en masse (en absence de solvant). En effet, lors de la synthèse du matériau, le polysaccharide est souvent utilisé sous la forme de particules  
25 dispersées dans le monomère fondu et la polymérisation est généralement conduite en présence d'un catalyseur. En absence de catalyseur, les degrés de polymérisation sont très faibles.

Ont également été décrites dans le brevet US 6 007 845 des particules dérivant d'un matériau obtenu par couplage covalent sur un  
30 matériau multifonctionnel de type acide citrique ou tartarique, d'une ou plusieurs molécules d'un polymère hydrophile comme le polyéthylène

glycol et d'une ou plusieurs molécules d'un polymère hydrophobe comme l'acide polylactique. Toutefois, la synthèse de ce matériau a pour inconvénient majeur de nécessiter l'utilisation d'un composé annexe jouant le rôle d'intercalaire entre les molécules des deux types de polymères.

La présente invention a pour premier objet un nouveau matériau composite à structure contrôlée dérivant du couplage de chaînes de polymère biodégradable directement sur le squelette de polysaccharides.

Son second objet concerne un vecteur à base de ce matériau, de préférence sous forme de particules, et plus préférentiellement sous la forme de nanoparticules.

L'invention vise également dans un troisième objet, l'utilisation de ce vecteur, de préférence de particules, notamment à titre de véhicules biologiques.

Plus précisément, le premier aspect de l'invention concerne un matériau à structure chimique contrôlée composé d'au moins un polymère biodégradable et d'un polysaccharide à squelette linéaire, ramifié ou réticulé, caractérisé en ce qu'il dérive de la fonctionnalisation contrôlée d'au moins une molécule dudit polymère biodégradable ou d'un de ses dérivés par greffage covalent directement au niveau de sa structure polymérique, d'au moins une molécule dudit polysaccharide.

Par opposition aux matériaux précédemment évoqués, le matériau mis au point selon la présente invention a pour premier avantage d'avoir une structure chimique contrôlée et donc d'être à ce titre parfaitement reproductible. Sa composition chimique est clairement identifiée.

Ainsi, le matériau revendiqué est de préférence constitué d'au moins 90% en poids et plus préférentiellement en totalité d'un copolymère dérivant de la fonctionnalisation contrôlée d'au moins une molécule d'un polymère biodégradable ou d'un de ses dérivés par greffage covalent

directement au niveau de sa structure polymérique d'au moins une molécule d'un polysaccharide à squelette linéaire, ramifié ou réticulé.

Selon un mode préféré de l'invention, le matériau revendiqué ne contient pas de molécule de départ, c'est-à-dire dudit polymère  
5 biodégradable ou dudit polysaccharide.

En l'espèce, le matériau revendiqué est donc différent d'un mélange de nature polymérique dans lequel serait présent le copolymère attendu mais où demeureraient également, en des quantités très variables, les polymères de départ. Un tel mélange de nature polymérique  
10 ne peut être utilisé tel quel pour préparer des nano- ou micro- particules.

En l'occurrence, le matériau revendiqué possède une polydispersité inférieure ou égale à 2 et de préférence inférieure à 1,5.

Plus précisément, le matériau revendiqué est obtenu par couplage directement au niveau de la molécule du polysaccharide, d'une ou  
15 plusieurs molécules de polymère biodégradable, identiques ou différentes.

Cette liaison covalente entre les deux types de molécule peut être de natures diverses.

Elle peut ainsi dériver de la réaction entre un groupement acide carboxylique avec soit une fonction amine pour former une liaison amide,  
20 soit une fonction hydroxyle pour former une liaison ester.

Elle peut aussi résulter de la réaction entre un groupement isocyanate avec un groupement alcool pour former une liaison de type uréthane.

Elle peut également dériver de la réaction d'une fonction thiol  
25 avec un groupement carboxylique pour conduire à une liaison de type thioester.

L'ensemble de ces réactions est bien connu de l'homme de l'art et leurs réalisations relèvent de ses compétences.

Selon une variante préférée de l'invention, la liaison covalente  
30 établie entre les deux molécules est de type ester ou amide.

Plus préférentiellement, elle dérive de la réaction entre une fonction carboxylique, le cas échéant activée, présente sur le polymère biodégradable et une fonction hydroxyle ou amine présente sur le polysaccharide. Les fonctions activées préférées de l'acide sont l'ester de  
5 N-hydroxysuccinimide, le chlorure d'acide et l'imidazolide dérivé du carbonyl diimidazole. Cette fonction réactive, de préférence carboxylique, peut être soit naturellement présente sur le squelette du polymère biodégradable ou y avoir été introduite au préalable au niveau de son squelette, de manière à permettre son couplage ultérieur avec une  
10 molécule de polysaccharide.

Cette activation d'une fonction présente sur l'une des molécules, de préférence une fonction carboxylique sur le polymère biodégradable, est notamment avantageuse lorsque l'on veut empêcher la manifestation d'une réaction secondaire parasite, comme par exemple une réaction  
15 intramoléculaire. Ainsi, dans le cas particulier où le polysaccharide possède au niveau de sa molécule deux fonctions susceptibles de réagir l'une avec l'autre, par exemple une fonction hydroxyle et une fonction carboxylique, on active préalablement la fonction carboxylique présente sur le polymère biodégradable de manière à privilégier la cinétique de sa  
20 réaction de couplage avec la fonction hydroxyle du polysaccharide au détriment de celle d'une réaction intramoléculaire au niveau de la molécule du polysaccharide.

La reproductibilité et l'homogénéité du matériau correspondant sont ainsi assurées.

25 Le matériau selon l'invention a également pour avantage de posséder une biodégradabilité satisfaisante en raison de la nature des polymères qui le constituent.

Au sens de l'invention, on entend désigner sous l'appellation « biodégradable » tout polymère qui se dissout ou se dégrade en une  
30 période acceptable pour l'application à laquelle il est destiné, habituellement en thérapie in vivo. Généralement, cette période doit être

inférieure à 5 ans et plus préférentiellement à une année lorsque l'on expose une solution physiologique correspondante avec un pH de 6 à 8 et à une température comprise entre 25°C et 37°C.

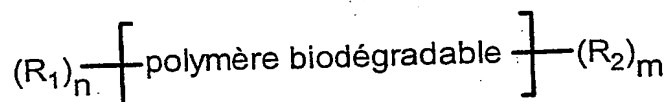
Les chaînes de polymères biodégradables selon l'invention sont  
5 ou dérivent de polymères biodégradables synthétiques ou naturels.

Classiquement, les polymères biodégradables synthétiques les plus employés sont les polyesters : PLA, PGA, PCL, et leurs copolymères, comme par exemple PLGA. En effet, leur biodégradabilité et biocompatibilité ont été largement établies. D'autres polymères  
10 synthétiques font également l'objet d'investigations. Il s'agit des polyanhydrides, poly(alkylcyanoacrylates), polyorthoesters, polyphosphazènes, polyaminoacides, polyamidoamines, polyméthylidènemalonate, polysiloxane, polyesters comme le polyhydroxybutyrate ou le poly(acide malique), ainsi que leurs  
15 copolymères et dérivés. Des polymères biodégradables naturels (protéines comme l'albumine ou la gélatine, ou des polysaccharides comme l'alginate, le dextrane ou le chitosane) peuvent également convenir.

En l'espèce, les polymères synthétiques sont tout particulièrement  
20 intéressants car leur bioérosion est observée rapidement. Toutefois, ces polymères ne sont pas toujours adaptés à être couplés avec un ou plusieurs polysaccharides car ils ne possèdent quasiment pas de groupements réactifs, surtout dans le cas des polyesters biodégradables (PLA, PCL, ...), et/ou parce que ces groupements réactifs n'existent qu'en  
25 extrémité de chaîne. En conséquence, le couplage de ces polymères avec un polysaccharide implique une fonctionnalisation préalable de leurs chaînes avec des groupements réactifs tout en contrôlant la nature des groupements naturellement présents en extrémité de chaîne. Ce sont notamment les composés ainsi obtenus que l'on entend désigner dans le  
30 cadre de la présente invention par le terme de dérivés de polymères biodégradables.



C'est ainsi que le polymère biodégradable répond de préférence à la formule générale I :



5

dans laquelle :

- n et m représentent indépendamment l'un de l'autre, soit 0, soit 1,
- $R_1$  représente un groupement alkyle en  $C_1$ - $C_{20}$ , un polymère différent du polymère biodégradable [par exemple poly(éthylène glycol) (PEG), ou un copolymère contenant des blocs de PEG ou des unités d'oxyde d'éthylène, comme par exemple un polymère Pluronic®], une fonction réactive protégée présente sur le polymère (ex. BOC-NH-), une fonction carboxylique activée ou non, ou une fonction hydroxyle, et
- $R_2$  représente une fonction hydroxyle ou une fonction carboxylique activée ou non.

15

Sont notamment préférés comme polymères biodégradables selon l'invention, les polyesters : poly(acide lactique) (PLA), poly(acide glycolique) (PGA), poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), et leurs copolymères, comme par exemple le poly(acide lactique-co-acide glycolique) (PLGA), les polymères synthétiques tels les polyanhydrides, poly(alkylcyanoacrylates), polyorthoesters, polyphosphazènes, polyamides (ex. polycaprolactame), polyaminoacides, polyamidoamines, polyméthylidène malonate, poly(alkylène d-tartrate), polycarbonates, polysiloxane, polyesters comme le polyhydroxybutyrate ou polyhydroxyvalérate, ou le poly(acide malique), ainsi que les copolymères de ces matériaux et leurs dérivés.

20

25

Il s'agit plus préférentiellement d'un polyester de poids moléculaire inférieur à 50 000 g/mole et notamment d'un polycaprolactone.

30

Outre un aspect avantageux en terme de biodégradabilité, le matériau selon l'invention est particulièrement intéressant en terme de propriétés de bioadhésion et de ciblage pour les particules qui en dérivent au niveau d'organes et/ou de cellules. C'est en particulier à travers le  
5 choix du polysaccharide associé, et notamment sa composition et son organisation structurale au niveau des particules, que ce second aspect est plus précisément atteint.

Le ou les polysaccharides mis en œuvre selon l'invention sont des polysaccharides de structure linéaire, ramifiée ou réticulée, modifiée ou  
10 non.

Sous cette définition, on entend exclure du domaine de l'invention, les polysaccharides possédant une structure cyclique à l'image des cyclodextrines.

On entend par polysaccharide modifié tout polysaccharide ayant  
15 subi un changement au niveau de son squelette, comme par exemple l'introduction de fonctions réactives, le greffage d'entités chimiques (molécules, chaînons aliphatiques, chaînes de PEG, etc...). Bien sur, cette modification doit concerner peu des groupements hydroxyle ou amine présents sur le squelette, de manière à laisser la grande majorité  
20 d'entre eux libres pour permettre ensuite le couplage des polymères biodégradables. Ainsi, il existe dans le commerce des polysaccharides modifiés par greffage de la biotine, de composés fluorescents, etc... D'autres polysaccharides greffés avec des chaînes hydrophiles (ex. PEG) ont été décrites dans la littérature.

25 Sous le terme réticulé, il est fait référence à des polymères formant un réseau tridimensionnel par opposition à des polymères linéaires simplifiés. Dans le réseau tridimensionnel, les chaînes sont connectées entre elles par des liaisons covalentes ou ioniques et les matériaux deviennent ainsi insolubles.

30 Les polysaccharides convenant tout particulièrement à l'invention sont ou dérivent de la D-glucose (cellulose, amidon, dextrane),

D-galactose, D-mannose, D-fructose (galactosane, manane, fructosane). La majorité de ces polysaccharides contiennent les éléments carbone, oxygène et hydrogène. Les polysaccharides conformes à l'invention peuvent contenir aussi du soufre et/ou de l'azote. Ainsi, l'acide  
5 hyaluronique (composé d'unités N-acétyl glucosamine et acide glucuronique), le chitosane, la chitine, l'héparine ou l'ovomucoïde contiennent de l'azote, tandis que la gélose, polysaccharide extrait d'algues marines, contient du soufre sous la forme de sulfate acide ( $>\text{CH-O-SO}_3\text{H}$ ). L'acide chondroïtin-sulfurique contient simultanément du soufre  
10 et de l'azote.

L'ensemble de ces polysaccharides peut être fonctionnalisé avec des polymères biodégradables selon l'invention, dans la mesure où ils possèdent naturellement des fonctions amine et/ou alcool libres.

Selon une variante préférée de l'invention, le polysaccharide  
15 possède un poids moléculaire supérieur ou égal à 6000 g/mole.

Dans le cas particulier du dextrane et de l'amilose ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ )<sub>n</sub>, n varie entre 10 et 620 et de préférence entre 33 et 220. Dans le cas de l'acide hyaluronique, la masse molaire varie entre  $5 \cdot 10^3$  et  $5 \cdot 10^6$  g/mole, de préférence entre  $5 \cdot 10^4$  et  $2 \cdot 10^6$  g/mole. Dans le cas du chitosane, la  
20 masse molaire varie entre  $6 \cdot 10^3$  et  $6 \cdot 10^5$  g/mole, de préférence entre  $6 \cdot 10^3$  et  $15 \cdot 10^4$  g/mole g/mole.

A titre illustratif des polysaccharides convenant plus particulièrement à l'invention, on peut citer les polydextroses comme le dextrane, le chitosane, le pullulane, l'amidon, l'amilose, l'acide  
25 hyaluronique, l'héparine, l'amilopectine, la cellulose, la pectine, l'alginate, le curdlan, le fucane, le succinoglycane, la chitine, le xylane, la xanthane, l'arabinane, la carragheénane, l'acide polyguluronique, l'acide polymannuronique, et leurs dérivés (comme par exemple le sulfate de dextrane, les esters de l'amilose, l'acétate de cellulose, etc).

30 Sont plus particulièrement préférés le dextrane, l'amilose, le chitosane et l'acide hyaluronique, et leurs dérivés.

Le matériau selon l'invention, sous forme de copolymère, peut inclure le polymère biodégradable et le polysaccharide dans un rapport massique variant de 1 :20 à 20 :1 et de préférence de 2 :9 à 2 :1.

A titre illustratif des matériaux revendiqués, on peut plus particulièrement citer ceux composés d'un copolymère dextrane-  
5 polycaprolactone, amidose-polycaprolactone, acide hyaluronique-polycaprolactone ou chitosane-polycaprolactone.

Les copolymères constituant le matériau revendiqué peuvent se présenter sous la forme de copolymères di-blocs, posséder une structure  
10 peigne ou encore une structure réticulée.

La nature préférée du squelette est un polysaccharide, et la nature préférée des greffons est un polymère biodégradable.

Des copolymères di-blocs ou peigne peuvent être obtenus en jouant sur le rapport molaire polysaccharide : polymère biodégradable  
15 lors de la synthèse. Les copolymères à structure réticulée peuvent être obtenus à partir de polymères biodégradables comportant au moins deux fonctions réactives.

Le second aspect de la présente invention concerne un procédé  
20 de préparation du matériau revendiqué.

Plus précisément, ce procédé comprend la mise en présence d'au moins une molécule d'un polymère biodégradable ou un de ses dérivés portant au moins une fonction réactive F1 avec au moins une molécule d'un polysaccharide à squelette linéaire, ramifié ou réticulé et portant au  
25 moins une fonction réactive F2 capable de réagir avec la fonction F1, dans des conditions propices à la réaction entre les fonctions F1 et F2 pour établir une liaison covalente entre lesdites molécules et en ce que l'on récupère ledit matériau.

Dans le cas où le polymère biodégradable est le  
30 polycaprolactone, le procédé de préparation revendiqué ne requiert pas

l'utilisation d'un catalyseur comme les procédés conventionnels. Cette spécificité du procédé revendiqué est donc particulièrement avantageuse en terme d'innocuité et biodégradabilité au niveau du matériau résultant.

Avantageusement, il s'agit d'une réaction quantitative, c'est-à-dire  
5 au moins une fonction F1 présente sur les molécules de polysaccharides réagit avec une fonction F2 présente sur une molécule de polymère biodégradable.

A ces fins, la réaction est réalisée dans des conditions telles qu'est prévenue la manifestation d'une quelconque réaction parasite,  
10 notamment l'implication de l'une des fonctions F1 ou F2 dans une autre réaction que la réaction de couplage attendue. On entend ainsi éviter les réactions intramoléculaires évoquées précédemment.

Selon une variante préférée de l'invention, la fonction réactive présente sur le polymère biodégradable est une fonction acide ou une  
15 fonction acide activée et la fonction réactive sur le polysaccharide est une fonction hydroxyle ou amine. De préférence, le polysaccharide et le polymère biodégradable ou dérivé sont mis en présence dans un rapport massique variant de 1 :20 à 20 :1.

Dans le cas particulier où la fonction réactive présente sur le  
20 polymère biodégradable est une fonction acide, la réaction de couplage peut être réalisée par activation par exemple avec la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ou le carbonyldiimidazole (DCI). Cette réaction d'estérification relève des compétences de l'homme de l'art.

Plus préférentiellement, les polysaccharides et polymères  
25 biodégradables répondent aux définitions proposées précédemment. En particulier, ils peuvent dériver de molécules de polysaccharides ou polymères biodégradables, naturelles et qui ont été modifiées de manière à être fonctionnalisées conformément à la présente invention.

30 Un troisième aspect de l'invention concerne des vecteurs constitués d'un matériau conforme à l'invention.

Ces vecteurs sont de préférence des particules possédant une taille comprise entre 50 nm et 500  $\mu$ m et de préférence entre 80 nm et 100  $\mu$ m.

En fait, selon le protocole de préparation retenu pour préparer les  
5 particules à partir du matériau revendiqué, on peut fixer la taille de celles-ci.

Selon un mode préféré de l'invention, les particules ont une taille comprise entre 1 et 1000 nm et sont alors dénommées nanoparticules. Les particules de taille variant de 1 à plusieurs milliers de microns font  
10 référence à des microparticules.

Les nanoparticules ou microparticules revendiquées peuvent être préparées selon des méthodes déjà décrites dans la littérature, comme par exemple la technique d'émulsion/évaporation du solvant [R. Gurny et al. « *Development of biodegradable and injectable latices for controlled*  
15 *release of potent drugs* » Drug Dev. Ind. Pharm., vol 7, p. 1-25 1981)] ; la technique de nanoprécipitation à l'aide d'un solvant miscible à l'eau (FR 2 608 988 et EP 274 691). Il existe également des variantes de ces procédés. Par exemple, la technique dite de « double-émulsion », intéressante pour l'encapsulation de principes actifs hydrophiles, consiste  
20 à dissoudre ceux-ci dans une phase aqueuse, à former une émulsion de type eau/huile avec une phase organique contenant le polymère, puis à former une émulsion de type eau/huile/eau à l'aide d'une nouvelle phase aqueuse contenant un agent tensioactif. Après évaporation du solvant organique, on récupère des nano-ou des micro-sphères.

25 Dans le cadre de la présente invention, il a également été mis au point par les inventeurs une nouvelle méthode particulièrement avantageuse qui comprend :

- l'introduction d'un matériau conforme à l'invention, en mélange le cas échéant avec un autre composé et/ou une matière

active, dans un liquide, de préférence l'eau, à une concentration inférieure ou égale à 50 mg/ml,

- le chauffage de l'ensemble sous agitation jusqu'à une température propice à la fonte ou au ramollissement dudit matériau de manière à obtenir sa mise en dispersion sous forme de gouttelettes,
- le refroidissement de l'ensemble de manière à figer la structure ainsi obtenue, et
- la récupération des particules.

Il est à noter que ce procédé est plus particulièrement avantageux lorsque les polymères et copolymères constituant le matériau revendiqué comprennent à titre de polymère biodégradable un dérivé de polycaprolactone, et plus préférentiellement un dérivé de polycaprolactone de poids moléculaire inférieur à 5000 g/mole.

Le matériau selon la présente invention a l'avantage majeur de posséder des propriétés tensioactives, de par sa nature amphiphile. Ces propriétés peuvent donc être exploitées avantageusement lors de la préparation de particules, par exemple, de manière à éviter l'utilisation d'agents tensioactifs, systématiquement utilisés dans les procédés susmentionnés. En effet, ces derniers ne sont pas toujours biocompatibles et sont difficiles à éliminer en fin de procédé.

Un autre avantage du matériau selon la présente invention est d'offrir la possibilité de moduler les propriétés qui interviennent dans le procédé de fabrication de particules à travers le choix :

- du rapport massique polymère biodégradable polysaccharide et/ou
- des masses molaires des polymères biodégradables et des polysaccharides considérés.

Il est ainsi possible d'obtenir des copolymères hydrosolubles ou insolubles dans l'eau, ayant des balances hydrophile-lipophile pouvant

varier entre 2 et 18 (permettant donc de stabiliser des émulsions eau/huile ou huile/eau).

Par ailleurs, il est possible de tirer avantage, lors de la fabrication de particules, des propriétés particulières de certains polysaccharides composant ledit matériau. Par exemple, il est connu que les alginates, les  
5 pectines ayant un degré d'estérification faible, et la gomme xanthane peuvent former des gels en présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . On peut donc envisager de former des gels ou des particules à l'aide des matériaux polysaccharide-polymère biodégradable dans des conditions analogues.  
10 Ces particules posséderont l'avantage, par rapport à celles élaborées uniquement à partir de polysaccharides, de comporter des chaînes hydrophobes dans leur matrice, permettant un contrôle de la dégradation et une meilleure encapsulation en principes actifs de nature hydrophobe ou comportant des domaines hydrophobes comme certaines protéines.

15 De même, on peut envisager la formation de particules à partir de deux types de matériaux selon la présente invention, comme par exemple à partir de copolymères alginate-polymère biodégradable et chitosane-polymère biodégradable.

A titre représentatif des particules selon l'invention, on peut plus  
20 particulièrement citer celles constituées d'un matériau dérivant d'au moins une molécule de polyester liée par une liaison de type ester ou amide à au moins une molécule de polysaccharide choisie parmi le dextrane, le chitosane, l'acide hyaluronique et l'amilose. De préférence, il s'agit de particules composées d'un matériau dérivant d'un bloc de  
25 polycaprolactone ou de poly(acide lactique) lié par une liaison de type ester ou amide à au moins une molécule de polysaccharide choisie parmi le dextrane, le chitosane, l'acide hyaluronique et l'amilose.

En ce qui concerne les structures de particules pouvant être  
30 obtenues à partir du matériau selon l'invention et les procédés susmentionnés, elles peuvent être variables. On distingue ainsi :



- une structure de type cœur hydrophobe en polymère biodégradable (pouvant encapsuler des principes actifs)- couronne hydrophile en polysaccharide, obtenues soit à l'aide de l'un des procédés sus-mentionnés, soit par adsorption du matériau selon l'invention sur des particules préformées ;
- une structure des particules selon laquelle la matrice en polymère biodégradable contient des inclusions aqueuses qui peuvent être obtenues par un procédé de « double émulsion » et adaptées à l'encapsulation des principes actifs hydrophiles. Selon le mode opératoire choisi et la balance hydrophile-lipophile du matériau, le polysaccharide peut se disposer soit exclusivement au niveau des inclusions aqueuses, soit au niveau de ces inclusions et de la surface des particules. Il peut également protéger les principes actifs encapsulés (protéines, peptides, ...) vis-à-vis des interactions, souvent dénaturantes, avec le polymère biodégradable hydrophobe et le solvant organique ;
- une structure de type cœur hydrophile (polysaccharide) - couronne hydrophobe (polymère biodégradable), lorsque les particules sont élaborées à partir d'une émulsion huile dans huile (par exemple, huile silicone-acétone) ou eau dans huile dans huile ;
- une structure micellaire, obtenue grâce à l'autoassociation d'un matériau conforme à l'invention en phase aqueuse, et
- une structure dite gel formée par réticulation des polysaccharides avec des polymères biodégradables comportant au moins deux fonctions réactives.

Dans le cas de la présente invention, les particules se dégradent de préférence en une période s'étendant entre une heure et plusieurs semaines.

Les particules selon l'invention peuvent contenir une substance active qui peut être de nature hydrophile, hydrophobe ou amphiphile et biologiquement active.

Comme matières actives biologiques, on peut plus particulièrement citer les peptides, les protéines, les carbohydrates, les acides nucléiques, les lipides, les polysaccharides ou leurs mélanges. Il peut également s'agir de molécules organiques ou inorganiques synthétiques qui, administrées in vivo à un animal ou à un patient, sont susceptibles d'induire un effet biologique et/ou manifester une activité thérapeutique. Il peut ainsi s'agir d'antigènes, d'enzymes, d'hormones, de récepteurs, de peptides, de vitamines, de minéraux et/ou de stéroïdes.

A titre représentatif des médicaments susceptibles d'être incorporés dans ces particules, on peut citer les composés anti-inflammatoires, les anesthésiants, les agents chimiothérapeutiques, les immunotoxines, les agents immunosuppresseurs, les stéroïdes, les antibiotiques, les antiviraux, les antifongiques, les antiparasitaires, les substances vaccinales, les immunomodulateurs et les analgésiques.

De même, on peut envisager d'associer à ces matières actives des composés destinés à intervenir au niveau de leur profil de libération. Par exemple, on peut ajouter dans la composition des particules, des chaînes de PEG, ou de polyester (modifiés ou non), et obtenir ainsi des particules dites composites. Comme déjà évoqué précédemment, on peut également mélanger plusieurs types de matériaux selon la présente invention, pour obtenir des particules mixtes, dans le but d'intervenir au niveau du profil de libération des matières encapsulées et d'obtenir des propriétés de surface des particules adaptées aux applications envisagées.

Enfin, on peut également incorporer dans les particules, des composés à finalité de diagnostic. Il peut ainsi s'agir de substances détectables par rayons X, fluorescence, ultrasons, résonance magnétique nucléaire ou radioactivité. Les particules peuvent ainsi inclure des

particules magnétiques, des matériaux radio-opaques (comme par exemple l'air ou le barium) ou des composés fluorescents. Par exemple, les composés fluorescents comme la rhodamine ou le rouge de Nile peuvent être englobés dans des particules à cœur hydrophobe.

5 Alternativement, des émetteurs gamma (par exemple Indium ou Technetium) peuvent y être incorporés. Des composés fluorescents hydrophiles peuvent également être encapsulés dans les particules, mais avec un rendement moindre comparativement aux composés hydrophobes, du fait de la moindre affinité avec la matrice.

10 Des particules magnétiques commercialisées ayant des propriétés de surface contrôlées peuvent être également incorporées dans la matrice des particules ou attachées de manière covalente à l'un de leurs constituants.

La matière active peut être incorporée dans ces particules lors de leur processus de formation ou au contraire être chargée au niveau des  
15 particules une fois que celles-ci sont obtenues.

Les particules conformes à l'invention peuvent comprendre jusqu'à 95% en poids d'une matière active.

La matière active peut ainsi être présente en une quantité variant  
20 de 0,001 à 990 mg/g de particule et préférentiellement de 0,1 à 500 mg/g. Il est à noter que dans le cas de l'encapsulation de certains composés macromoléculaires (ADN, oligonucléotides, protéines, peptides, etc) des charges encore plus faibles peuvent être suffisantes.

Les particules selon l'invention peuvent être administrées de  
25 différentes façons, par exemple par voies orale, parentérale, oculaire, pulmonaire, nasale, vaginale, cutanée, buccale, etc... La voie orale, non invasive, est une voie de choix.

De manière générale, les particules administrées par voie orale peuvent subir différents processus : translocation (capture puis passage  
30 de l'épithélium digestif par les particules intactes), bioadhésion (immobilisation des particules à la surface de la muqueuse par un

mécanisme d'adhésion) et transit. Pour ces deux premiers phénomènes, les propriétés de surface jouent un rôle majeur.

Le fait que les particules selon l'invention possèdent en surface de nombreuses fonctions hydroxyles, s'avère particulièrement avantageux pour y lier une molécule biologiquement active, une molécule à vocation de ciblage ou pouvant être détectée. On peut ainsi envisager de fonctionnaliser la surface de ces particules de manière à en modifier les propriétés de surface et/ou les cibler plus spécifiquement vers certains tissus ou organes. Eventuellement, les particules ainsi fonctionnalisées peuvent être maintenues au niveau de la cible par l'utilisation d'un champ magnétique, pendant l'imagerie médicale ou pendant qu'un composé actif est libéré. De même, des ligands de type molécules de ciblage comme des récepteurs, lectines, anticorps ou fragments de ceux-ci peuvent être fixés à la surface des particules. Ce type de fonctionnalisation relève des compétences de l'homme de l'art.

Le couplage de ces ligands ou molécules à la surface des particules peut être exécuté de différentes manières. Il peut être réalisé de manière covalente en attachant le ligand au polysaccharide recouvrant les particules ou de façon non covalente c'est à dire par affinité. Ainsi, certaines lectines ont pu être attachées par affinité spécifique aux polysaccharides situés à la surface de particules selon la présente invention, en exaltant ainsi les propriétés de reconnaissance cellulaire de ces particules. Il peut également être avantageux de greffer le ligand par l'intermédiaire d'un bras espaceur, pour lui permettre d'atteindre sa cible dans une conformation optimale. Alternativement, le ligand peut être porté par un autre polymère entrant dans la composition des particules.

L'invention concerne également l'utilisation des vecteurs et de préférence des particules obtenues selon l'invention pour encapsuler une ou plusieurs matières actives telles que définies précédemment.

Un autre aspect de l'invention concerne également les compositions pharmaceutiques ou de diagnostic comprenant des vecteurs et de préférence des particules selon l'invention, le cas échéant associées à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et compatible.

5 Par exemple, les particules peuvent être administrées dans des capsules gastro-résistantes, ou incorporées dans des gels, implants ou tablettes. Elles peuvent aussi être préparées directement dans une huile (comme le Migliol®) et cette suspension administrée dans une capsule ou injectée au niveau d'un site précis (par exemple tumeur).

10 Ces particules sont en particulier utiles à titre de vecteurs furtifs, c'est-à-dire capables d'échapper au système de défense immunitaire de l'organisme et/ou comme vecteurs bioadhésifs.

Les exemples et figures figurant ci-après sont présentés à titre  
15 illustratif et non limitatif de la présente invention.

#### Figures :

Figure 1 : Représentation à l'aide d'un microscope optique de  
20 particules R-PCL-COOH fabriquées selon l'exemple 13 (polymère synthétisé selon l'exemple 1).

Figure 2: Distribution de diamètres hydrodynamiques de particules R-PCL-COOH.

#### EXEMPLE 1

##### R-PCL-COOH

Des polymères PCL monofonctionnalisés de faible masse molaire (2 à 4000 g/mole) du type R-PCL-CO<sub>2</sub>H (R= C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>) sont obtenus à partir de 5,2 g de monomère ( $\epsilon$ -caprolactone fraîchement distillé) et 0,3 g  
30 d'acide caprique (C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>CO<sub>2</sub>H) de haute pureté. L'acide et le  $\epsilon$ -caprolactone ont été introduits dans un ballon surmonté d'un réfrigérant

ascendant. Après une purge des réactifs, le ballon a été introduit dans un bain d'huile thermostaté à 225°C. La réaction s'est poursuivie pendant 3h30 sous atmosphère inerte (argon). Elle a été stoppée par immersion du ballon dans un bain de glace. Le solide obtenu a été dissout à chaud  
5 dans 15 ml THF, puis a été précipité à température ambiante avec du méthanol froid.

Après trois reprecipitations, le rendement en poids de la réaction est 60-70%. Les masses molaires moyennes en nombre (Mn) et en poids (Mw) ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (CES)  
10 (éluant THF 1ml/min, calibration universelle réalisée avec des standards de polystyrène). Mn est égale à 3420 g/mole et Mw à 4890 g/mole ; l'indice de polydispersité est donc égal à 1,4.

Une masse molaire moyenne en nombre égale à 3200 g/mole a été déterminée par titration avec une solution KOH/EtOH 10<sup>-2</sup> M des  
15 échantillons de polymères d'environ 100 mg dissous dans un mélange acétone-eau.

D'autres polymères avec des R différents ont été obtenus par la même méthode, par exemple à partir de l'acide caproïque (R=C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>).

## 20 EXEMPLE 2.

### HOOC-PCL-COOH

Le polymère bifonctionnalisé HOOC-PCL-COOH a été synthétisé d'après le mode opératoire de l'exemple 1.

L'acide succinique (99,9%, Aldrich) utilisé comme amorceur a été  
25 séché sous vide à 110°C pendant 24h. Le monomère ( $\epsilon$ -caprolactone) a été purifié par distillation sur hydrure de calcium.

La polymérisation à partir de 0,2 g d'acide succinique et de 4 g de  $\epsilon$ -caprolactone a permis d'obtenir après 3h de réaction 3,2 g de polymère (rendement en poids 76% après quatre précipitations successives).

Le dosage des groupements COOH terminaux par KOH/EtOH  $10^{-2}$  M a permis de déterminer une acidité correspondant à une masse molaire de 3500 g/mole.

Par CES,  $M_n$  est égale à 4060 g/mole et  $M_w$  à 4810 g/mole, l'indice de polydispersité est de 1,2.

D'autres polymères de masse variable sont obtenus en changeant le rapport molaire acide : monomère.

### EXEMPLE 3.

#### R-PLA-COOH ( $R=C_9H_{19}$ )

Le monomère (D,L-lactide) a été purifié par deux recristallisations dans l'acétate d'éthyle suivies de sublimation. Le catalyseur (octanoate d'étain) a été purifié par distillation sous vide très poussé. L'acide caprique utilisé comme amorceur a été purifié par recristallisation dans l'acétate d'éthyle, puis anhydrisé par distillation azéotropique avec du benzène.

L'acide caprique (0,12 g) et le D,L-lactide (3,5 g) ont été introduits dans un bicol muni d'un réfrigérant ascendant connecté à une rampe à vide/argon. Le ballon de réaction a été inerté, puis 7 ml de toluène anhydre ont été rajoutés à travers le septum. Après dissolution, 0,284 g de catalyseur ont été introduits et la réaction a été immédiatement démarrée par immersion du ballon dans un bain d'huile à  $120^{\circ}\text{C}$ . Après 4 heures, la réaction a été stoppée, le toluène a été évaporé, et le polymère appelé R-PLA-COOH a été dissout dans du dichlorométhane et précipité avec de l'éthanol. Après quatre précipitations successives, il a été obtenu une acidité constante dans le polymère, qui a été ensuite séché.

La masse molaire  $M_w$  déterminée par CES est 22 Kg/mole. Le dosage des groupements terminaux par KOH/EtOH  $10^{-2}$  M a permis de déterminer une acidité correspondant à une masse molaire de 21 Kg/mole.

En variant le rapport molaire monomère/amorceur et le temps de réaction, il a été possible d'obtenir des polymères ayant des masses molaires comprises entre 10 et 50 Kg/mole.

5        EXEMPLE 4.

R-PCL-OH et R-PLA-OH (R= alkyle)

Des polymères PCL ou PLA monofonctionnalisés en bout de chaîne par un groupement alcool (R-PCL-OH ou R-PLA-OH) ont été synthétisés selon le protocole de l'exemple 3, mais en substituant à  
10 l'amorceur acide, un amorceur alcool, par exemple C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>OH.

5g de caprolactone et 0,29 g d'alcool heptilique ont été chauffés dans du toluène au reflux pendant 2h sous atmosphère inerte et en présence d'octanoate d'étain en quantité équimolaire avec l'amorceur. Après deux précipitations, le rendement massique de la réaction est 54%.  
15 La masse molaire Mw est de 2100 g/mole.

Le test avec KOH/EtOH n'a pas permis de détecter des traces d'acidité libre.

EXEMPLE 5.

20        R-PEG-PLA-COOH (R=OMe)

L'amorceur acide, le poly(éthylène glycol) comportant à un bout de chaîne un groupement méthoxy et à l'autre un groupement acide carboxylique (MeO-PEG-COOH) (Shearwater Polymers, 5000g/mole) a été séché préalablement à la réaction. Le lactide a été purifié par deux  
25 recristallisations (acétate d'éthyle) et par sublimation. Le rapport massique des réactifs MeO-PEG-COOH :lactide a été 1 :9 et le rapport molaire MeO-PEG-COOH :catalyseur a été 1 :1. La polymérisation s'est poursuivie pendant 2h sous atmosphère inerte au reflux du toluène (solvant). Après évaporation du toluène, le copolymère est purifié par  
30 deux précipitations successives. La masse Mw déterminée par CES est de 42Kg/mole.



### EXEMPLE 6.

#### R-PCL-ester de NHSI (R=alkyle)

La fonction acide des polymères R-PCL-COOH (exemple1) est transformée dans l'ester activé en la faisant réagir avec la N-hydroxy succinimide (NHSI), en présence de dicyclohexyl carbodiimide (DCC), dans un mélange DMF :CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1 :2 (v :v). La DCC a été rajouté en léger excès molaire (1,1) par rapport aux chaînes de R-PCL-COOH et la NHSI en excès par rapport aux fonctions -COOH. Les réactifs ont été solubilisés dans un volume minimal de solvant, avec un léger chauffage. La réaction a lieu à 50°C pendant 24h sous atmosphère inerte. Après filtration de l'urée formée (DCU), les solvants sont évaporés et le DMF est entraîné avec de l'éther. Le polymère est lavé à l'eau et séché. D'après la masse de DCU pesée à chaque synthèse de ce type, le rendement de la réaction est quantitatif. L'ester ainsi obtenu est soluble dans THF, acétone, solvants chlorés, etc...

### EXEMPLE 7

#### PCL-DEX

Le polymère R-PCL-ester NHSI (R=C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>) possédant la fonction ester activée (exemple 6) est dissout dans du DMSO, puis une quantité égale de dextran (Pharmacia, masse molaire 40 000 g/mole) est introduite. La réaction de couplage a lieu pendant 144 heures à 70°C sous argon. La réaction de transestérification a lieu avec libération de NHSI. Après évaporation des solvants, le produit final est lavé à l'eau pour enlever le NHSI et des copolymères hydrosolubles, puis avec du dichlorométhane pour extraire des traces de polyester non réagi.

On obtient avec un rendement de 40% un copolymère Dex-PCL, de type peigne, comportant un squelette de dextrane (Dex) (masse molaire 40000 g/mole) et des chaînons latéraux de PCL liés par des ponts ester. Le copolymère est purifié en fin de réaction. Sa composition globale

est déterminée par microanalyse élémentaire et par RMN. Le copolymère contient 33% en poids de PCL.

Le même protocole a été utilisé pour un dextrane de masse molaire plus faible, 6000g/mole (Fluka).

5

### EXEMPLE 8

#### Dex-PCL

3g de R-PCL-COOH (exemple 1) sont anhydrisés par distillation azéotropique, puis séchés sous vide à 40-50°C, pendant une nuit,  
10 directement dans le ballon de réaction de 50 ml surmonté d'un réfrigérant ascendant et connecté à une rampe vide/argon. On rajoute ensuite dans le ballon 5 ml de THF sec. Après dissolution de l'acide, on rajoute dans le ballon 0,243 g de carbonyle diimidazole (CDI) qui se dissout rapidement. Le mélange inerte est porté au reflux du THF. On observe un dégagement  
15 de CO<sub>2</sub>. Après 3 heures, le THF est évaporé.

1,29 g de dextrane (Fluka, masse molaire 6000 g/mole) préalablement anhydrisé sont dissous à chaud dans 7 ml de DMSO anhydre, puis rajoutés dans le ballon de réaction contenant l'intermédiaire imidazolide de l'acide R-PCL-COOH. On chauffe le mélange de réaction à  
20 130°C pendant 3 heures. La solution devient brunâtre. On évapore le DMSO puis on dissout le produit de réaction dans du chloroforme et on l'introduit dans une ampoule à décanter. On l'extraît avec de l'eau distillée. La phase aqueuse se présente comme une émulsion abondante stable. Après évaporation du solvant, on ne retrouve pratiquement pas de  
25 résidu dans la phase organique. On évapore la phase aqueuse et on obtient ainsi un précipité qu'on sépare. On lave le polymère ainsi obtenu avec de l'éther puis on le sèche. La masse molaire déterminée par CES (tableau 1) est de 11000 g/mole. Cette méthode avec rendement élevé (> 80 %), rapide et sélective, est préférée par la suite.

30 En variant le rapport massique dextrane : R-PCL-COOH dans la synthèse du Dex-PCL, il est possible d'obtenir par cette méthode une

série de copolymères Dex-PCL contenant des taux massiques de Dex variables. Ces copolymères ont été caractérisés par chromatographie de perméation sur gel (détecteurs réfractomètre et viscosimètre, à 70°C), à l'aide d'une colonne ViscoGel (GMHHR-H, Viscotek, GB), étalonnée avec des standards de Pullulane. Les copolymères Dex-PCL ont été dissous dans du diméthyle acétamide (DMAC) à des concentrations de 5 mg/ml. Les volumes injectés ont été 100 µl. L'éluant a été DMAC contenant 0,4% LiBr, à un débit de 0,5 ml/min. Les masses molaires ont été déterminées par la méthode de la calibration universelle. Quelques exemples figurent dans le tableau 1.

| Copolymère      | Dextrane | Dex-PCL<br>7 chaînons PCL par<br>chaîne de Dextrane | Dex-PCL<br>5 chaînons PCL par<br>chaîne de Dextrane | Dex-PCL<br>3 chaînons PCL par<br>chaîne de Dextrane |
|-----------------|----------|---|---|---|
| Mw              | 4985     | 19060   | 16000   | 10870   |
| Mn              | 4670     | 13510   | 11650   | 9878  |
| Pd              | 1,06     | 1,41  | 1,37  | 1,10  |
| IVn (dl/g)      | 0,087    | 0,098   | 0,12  | 0,12  |
| Rgw (nm)        | 2,47     | 3,92  | 4,07  | 3,57  |
| Dn/dc<br>(ml/g) | 0,147    | 0,052   | 0,084   | 0,088   |

Le Dex-PCL7 dérive de la mise en présence de dextrane à raison de 5% et de PCL à raison de 95%.

Le Dex-PCL5 dérive de la mise en présence de dextrane à raison de 20% et de PCL à raison de 80%.

Le Dex-PCL3 dérive de la mise en présence de dextrane à raison de 33% et de PCL à raison de 67%.

Tableau 1. Caractéristiques du dextrane de départ et de trois copolymères Dex-PCL comportant respectivement 7, 5 ou 3 chaînons de PCL greffés au niveau du squelette de dextrane, synthétisés en utilisant

dans le mélange réactionnel 5, 20 ou 33 % en poids de dextrane (par rapport au poids total de RPCL-COOH et de dextrane) :

Mw : masse molaire moyenne en poids

Mn : masse molaire moyenne en nombre

5 Pd : polydispersité ( $=M_w/M_n$ )

lvw : viscosité intrinsèque moyenne en poids

Rgw : rayon de giration moyen en poids

dn/dc : variation de l'indice de réfraction spécifique avec la concentration.

10 Les trois copolymères présentent une faible polydispersité et des masses molaires moyennes en poids comprises entre 11000 et 19000 g/mole.

#### EXEMPLE 9

##### 15 amilose-PCL

0,2g amilose (Fluka, extraite de pommes de terre) sont dissous dans 8ml DMSO. Il résulte une solution trouble, à laquelle on rajoute 0,2 g de R-PCL-ester de NHSI (exemple 6) dissout dans 3 ml DMSO. Ce mélange est incubé à 70°C pendant 144h. Après évaporation des solvants, le solide est repris avec 200 ml eau et 200 ml chloroforme dans une ampoule à décanter. La phase intermédiaire contenant le polymère amphiphile est récupérée et extraite encore une fois, puis séchée. Ce traitement est une variante de la méthode de purification de l'exemple 7.

20 Le rendement en poids après la deuxième extraction est de 38% (pds).

Les résultats de la microanalyse permettent de déterminer la composition globale du copolymère amphiphile obtenu, qui contient 32% en poids de PCL.

EXEMPLE 10.Chitosane-PCL

Le copolymère chitosane-polycaprolactone est obtenu selon le protocole de l'exemple 9. La synthèse a été effectuée à partir du chitosane brut (Fluka, 150000 g/mole) et le rendement d'obtention du copolymère a été 22% en poids. D'après la microanalyse élémentaire, le copolymère contient 67% en poids de PCL. Il est de type peigne, avec un squelette de chitosane et des chaînons latéraux de PCL liés majoritairement par des liaisons amides.

10

EXEMPLE 11HA-PCL

L'acide hyaluronique (Accros, masse molaire supérieure à  $10^6$  g/mole) sous la forme de carboxylate de sodium est dissous dans l'eau MilliQ, et converti sous la forme acide libre à l'aide d'une résine superéchangeuse de cation, et lyophilisé. Le produit ainsi obtenu est assez soluble dans le DMSO et permet de réaliser le couplage avec l'ester NHSI du R-PCL-COOH, d'après le protocole des exemples 7 et 9.

15

Le copolymère de type peigne acide hyaluronique-PCL est récupéré dans la phase aqueuse. Il n'y a pas de phase intermédiaire. D'après la microanalyse, ce copolymère contient 18% en poids de PCL.

20

EXEMPLE 12Nanoparticules R-PCL-COOH

Une masse bien définie de R-PCL-COOH synthétisé selon l'exemple 1 est dissoute dans l'acétone pour obtenir une concentration de 20mg/ml. Un volume d'eau égal au double du volume d'acétone est versé goutte-à-goutte. Spontanément, le polymère forme des nanosphères d'un diamètre moyen de 210 nm (mesuré après l'évaporation du solvant), en absence d'agent tensioactif.

30

### EXEMPLE 13

#### Nanoparticules Dex-PCL

Une masse bien définie de copolymère Dex-PCL synthétisé selon l'exemple 7 est introduite dans le dichlorométhane pour obtenir une concentration de 10 mg/ml. Le polymère est dispersé et gonflé par le solvant, mais il ne se dissout pas. Un volume d'eau deux à vingt fois supérieur au volume de dichlorométhane est rajouté. Une émulsion grossière est d'abord formée, puis affinée grâce aux ultrasons. Le copolymère amphiphile stabilise l'émulsion, en évitant ainsi la nécessité de rajouter des agents tensioactifs. Après évaporation du solvant organique, on obtient des nanoparticules.

Le diamètre moyen des particules est déterminé par diffusion de la lumière (PCS). La taille des particules, généralement inférieure à 300 nm par ce procédé, dépend de la concentration, du rapport des volumes des deux phases aqueuse et organique, du temps et de la puissance de sonication.

### EXEMPLE 14.

22 mg R-PCL-COOH (exemple 1) sont introduits dans 10 ml eau MilliQ et chauffés à 80°C sous agitation magnétique. Suite à la fusion du polymère à cette température, des particules sphériques ont été formées (Fig. 1). Le refroidissement du récipient a permis ensuite de figer les structures ainsi formées. Les particules ont pu être récupérées ensuite par sédimentation.

Il a été observé que le rajout de l'éthanol en faible quantité permettait d'améliorer la fabrication en évitant la formation de films à la surface de l'eau.

### EXEMPLE 15.

Des particules ont été formées selon le protocole de l'exemple 14, sauf qu'à la place de l'eau, une solution tampon acétate pH4,8 saturée en chitosane a été utilisée. Des particules sphériques ont été ainsi obtenues.

5

### EXEMPLE 16.

22 mg R-PCL-COOH (exemple 1) sont introduits dans 10 ml eau MilliQ et chauffés à 80°C. Une sonde à ultrasons a été plongée ensuite dans le récipient et des ultrasons ont été appliqués (20W, 20sec). Ceci a permis d'obtenir des microsphères d'un diamètre hydrodynamique moyen de 1,1  $\mu\text{m}$  (déterminé par PCS) et ayant une faible polydispersité (fig. 2).

10

Il a été noté que l'utilisation d'un ultraturax pouvait remplacer la sonication pour la formation des nanoparticules.

Il a été observé que le copolymère Dex-PCL (exemple 7) et le copolymère chitosane-PCL (exemple 9) formaient également des particules par ce procédé.

15

Il a été noté qu'il était également possible de former des particules par ce procédé en remplaçant l'eau par une huile (par exemple Migliol®) ou par un polymère (comme le PEG de masse molaire 200 g/mole). Ces essais ont été réalisés avec 25 mg de polymère dans 5 ml de liquide.

20

### EXEMPLE 17.

#### bioadhésion

L'interaction des particules selon l'invention avec des cellules Caco2 en culture, utilisées comme modèle d'interaction pour les particules destinées pour la voie orale a été étudiée. Le PLA tritié a été encapsulé comme marqueur radioactif dans des nanoparticules Dex-PCL (exemple 7) pour permettre de déterminer avec précision la localisation des particules (à l'intérieur ou à la surface des cellules ou dans le milieu de culture). Ce marquage s'est révélé parfaitement stable dans le milieu de culture, autorisant donc ces études. Des cellules Caco2 ont été cultivées

25

30

dans des plaques à 24 puits, avec changement du milieu (1,5 ml/puits DMEM 4,5 g/l glucose, 15% sérum de vœu fœtal) tous les 1 ou 2 jours jusqu'à confluence. Après environ 4 jours, lorsque les cellules sont arrivées à confluence, le milieu est retiré, on rajoute 1,5 ml de milieu Hank's, on attend 2h puis on rajoute les suspensions de nanosphères contenant des quantités bien définies de particules (dans un volume total de 100  $\mu$ l). L'activité par puits dans le milieu de culture a été fixée à 0,1  $\mu$ Ci. Après trois heures d'incubation à 37°C dans un incubateur à CO<sub>2</sub>, le surnageant a été retiré, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS, puis lysées pendant 1h avec 1ml de NaOH 0,1M. La radioactivité a été comptée dans le surnageant, les eaux de lavage et le lysat cellulaire. Ainsi, il a été possible de déterminer avec précision la quantité de nanoparticules effectivement associée aux cellules.

La quantité des nanoparticules Dex-PCL associée aux cellules Caco2 est double par rapport à celles en polyester (PLA, Phusis, Mw 40000 g/mole) fabriquées par la technique de la nanoprécipitation (exemple 10) en présence de Pluronic®. Ainsi, 2,5% et 1,1% respectivement des nanoparticules sont associées aux cellules.

## 20 EXEMPLE 18

### couplage de lectines par affinité, ciblage

Une suspension de nanoparticules radiomarquées, fabriquées à partir de Dex-PCL (exemple 7), est mise en contact avec une solution de lectine de pois (*Lens culinaris*) en excès par rapport aux particules, de manière à saturer la surface de celles-ci en lectine adsorbée par affinité. L'interaction des nanoparticules ainsi recouvertes de lectine avec des cellules Caco2 en culture est étudiée selon le protocole précédent (exemple 16).

La quantité des nanoparticules associée aux cellules Caco2 est significativement augmentée par rapport à celles non recouvertes de



lectine. Ainsi, 3,5% des nanoparticules introduites en chaque puits sont associées aux cellules, par rapport à 2,5% en absence de lectine.

### EXEMPLE 19

#### 5 Furtivité

La capacité de nanoparticules recouvertes de dextrane (fabriquées à partir de Dex-PCL, exemple 7) à éviter la capture par des cellules phagocytes (J774) a été comparée à celles de même taille (environ 200 nm) et recouvertes de PEG 5000 g/mole (fabriquées à partir  
10 de PEG-PLA synthétisé selon l'exemple 4, à partir de Me-O-PEG-OH 5000 g/mole et de lactide, avec une masse molaire du bloc de PLA de 50000 g/mole). Les cellules J774 ont été cultivées dans des plaques à 24 puits, dans un milieu DMEM contenant 4,5 g/l glucose et 10% sérum de vœu fœtal. Préalablement aux expériences, le surnageant des cellules a  
15 été renouvelé et on a attendu 4h avant de rajouter les suspensions de nanoparticules radiomarquées dans les puits. La capture des nanoparticules Dex-PCL et des nanoparticules de référence de même taille recouvertes par du PEG a été pratiquement la même (1 à 2%), malgré la capacité bien connue de ce type de cellules à phagocyter des  
20 nanoparticules. Ceci est une indication concernant le caractère « furtif » des nanoparticules recouvertes de dextrane, similaire à celui des particules recouvertes de PEG, bien connues dans la littérature.

## REVENDEICATIONS

1. Matériau à structure chimique contrôlée composé d'au moins un polymère biodégradable et d'un polysaccharide à squelette linéaire, ramifié ou réticulé, caractérisé en ce qu'il dérive de la fonctionnalisation contrôlée d'au moins une molécule dudit polymère biodégradable ou d'un de ses dérivés par greffage covalent directement au niveau de sa structure polymérique, d'au moins une molécule dudit polysaccharide.

2. Matériau selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué d'au moins 90% en poids d'un copolymère dérivant de la fonctionnalisation contrôlée d'au moins une molécule d'un polymère biodégradable ou d'un de ses dérivés par greffage covalent directement au niveau de sa structure polymérique d'au moins une molécule d'un polysaccharide à squelette linéaire, ramifié ou réticulé.

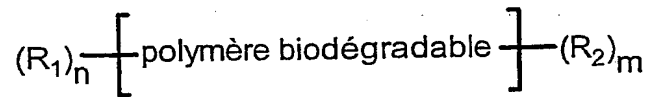
3. Matériau selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est dépourvu en produit de départ.

4. Matériau selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il possède une polydispersité inférieure ou égale à 2.

5. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la liaison covalente établie entre la molécule de polymère biodégradable et la molécule de polysaccharide est de nature ester ou amide.

6. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la liaison covalente dérive de la réaction entre une fonction hydroxyle ou une fonction amine présente sur la molécule du polysaccharide et une fonction carboxylique, activée ou non, présente sur la molécule du polymère biodégradable.

7. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le polymère biodégradable répond à la formule :



dans laquelle :

- n et m représentent indépendamment l'un de l'autre, soit 0, soit 1,
- $R_1$  représente un groupement alkyle en  $C_1$ - $C_{20}$ , un polymère différent du polymère biodégradable, une fonction réactive protégée présente sur le polymère, une fonction carboxylique, activée ou non, ou une fonction hydroxyle, et
- $R_2$  représente une fonction hydroxyle ou une fonction carboxylique activée ou non.

8. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le polymère biodégradable est ou dérive d'un poly(acide lactique) (PLA), poly(acide glycolique) (PGA), poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), les polymères synthétiques tels les polyanhydrides, poly(alkylcyanoacrylates), polyorthoesters, polyphosphazènes, polyamides, polyaminoacides, polyamidoamines, polyméthylidène malonate, poly(alkylène d-tartrate), polycarbonates, polysiloxane, polyesters comme le polyhydroxybutyrate ou polyhydroxyvalérate, ou le poly(acide malique), ainsi que leurs copolymères et dérivés.

9. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le polymère biodégradable est un polyester de poids moléculaire inférieur à 50.000 g/mole.

10. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le polymère biodégradable est un polycaprolactone.

11. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le polysaccharide possède un poids moléculaire supérieur ou égal à 6000 g/mole.

12. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le polysaccharide est choisi parmi le dextrane, le chitosane, le pullulane, l'amidon, l'amilose, l'acide hyaluronique, l'héparine, l'amilopectine, la cellulose, la pectine, l'alginate, le curdlan, le  
5 fucane, le succinoglycane, la chitine, le xylane, la xanthane, l'arabinane, la carragheenane, l'acide polyguluronique, l'acide polymannuronique, et leurs dérivés.

13. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il associe ou non un polymère biodégradable et un  
10 polysaccharide dans un rapport massique variant de 1 :20 à 20 :1 et de préférence de 2 :9 à 2 :1.

14. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme d'un copolymère di-bloc.

15. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il possède une structure peigne ou une structure réticulée.

16. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un copolymère possédant un squelette polysaccharide et des greffons polymères biodégradables.

20 17. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il dérive d'un copolymère choisi parmi dextrane-polycaprolactone, amilose-polycaprolactone, acide hyaluronique-polycaprolactone, et chitosane-polycaprolactone.

25 18. Procédé de préparation d'un matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on met en présence au moins une molécule d'un polymère biodégradable ou un de ses dérivés portant au moins une fonction réactive F1 avec au moins une molécule d'un polysaccharide à squelette linéaire, ramifié ou réticulé et portant au moins une fonction réactive F2 capable de réagir avec la

fonction F1, dans des conditions propices à la réaction entre les fonctions F1 et F2 pour établir une liaison covalente entre lesdites molécules et en ce que l'on récupère ledit matériau.

19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que  
5 le polymère biodégradable est tel que défini en revendications 7 à 10 et le polysaccharide selon la revendication 11 ou 12.

20. Procédé selon la revendication 18 ou 19, caractérisé en ce que la fonction réactive du polymère biodégradable est une fonction acide activée et celle du polysaccharide une fonction hydroxyle ou amine.

10 21. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le polysaccharide et le polymère biodégradable ou dérivé sont mis en présence dans un rapport massique variant de 1 :20 à 20 :1.

15 22. Vecteur obtenu à partir d'un matériau selon l'une des revendications 1 à 17.

23. Vecteur selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'il s'agit de particules.

24. Vecteur selon la revendication 22 ou 23, caractérisée en ce qu'il s'agit de microparticules ou nanoparticules.

20 25. Vecteur selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une substance active.

25 26. Vecteur selon la revendication 25, caractérisé en ce que la substance active est choisie parmi les peptides, protéines, carbohydrates, acides nucléiques, lipides ou des molécules organiques ou inorganiques susceptibles d'induire un effet biologique et/ou à activité thérapeutique.

27. Vecteur selon l'une des revendications 22 à 26, caractérisé en ce qu'il comprend jusqu'à 95% en poids d'une matière active.

5 28. Vecteur selon l'une des revendications 22 à 27, caractérisée en ce qu'il s'agit de particules comprenant en outre au moins une molécule liée de manière covalente à sa surface.

29. Vecteur selon l'une des revendications 22 à 27, caractérisée en ce qu'il s'agit de particules comprenant en outre au moins une molécule liée de manière non covalente à sa surface.

10 30. Vecteur selon la revendication 28 ou 29, caractérisée en ce que cette molécule est une molécule biologiquement active, une molécule à vocation de ciblage ou pouvant être détectée.

15 31. Vecteur selon la revendication 30, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une molécule de ciblage choisie parmi les anticorps et fragments d'anticorps et lectines.

20 32. Vecteur selon l'une des revendications 22 à 31, caractérisé en ce qu'il s'agit de particules constituées d'un matériau dérivant d'au moins une molécule de polyester liée par une liaison de type ester ou amide à au moins une molécule de polysaccharide choisie parmi le dextrane, le chitosane, l'acide hyaluronique et l'amilose.

25 33. Vecteur selon l'une des revendications 22 à 31, caractérisé en ce qu'il s'agit de particules constituées d'un matériau dérivant d'un bloc de polycaprolactone ou de poly(acide lactique) lié par une liaison de type ester ou amide à au moins une molécule de polysaccharide choisie parmi le dextrane, le chitosane, l'acide hyaluronique et l'amilose.

34. Procédé de préparation d'un vecteur sous forme de particules selon l'une des revendications 22 à 33, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

- l'introduction d'un matériau selon l'une des revendications 1 à 17, le cas échéant avec un autre composé et/ou une matière active, dans un liquide, de préférence l'eau, à une concentration inférieure ou égale à 50 mg/ml,

5                   - le chauffage de l'ensemble sous agitation jusqu'à une température propice à la fonte ou au ramollissement dudit matériau de manière à obtenir sa mise en dispersion sous forme de gouttelettes,

- le refroidissement de l'ensemble de manière à figer la structure ainsi obtenue, et

10                   - la récupération desdites particules.

35. Procédé selon la revendication 34, caractérisé en ce que le matériau est un copolymère de poly( $\epsilon$ -caprolactone) de poids moléculaire inférieur à 5000 g/mole.

15                   36. Procédé selon la revendication 34 ou 35, caractérisé en ce qu'il est réalisé en présence également de la matière active à encapsuler.

37. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 17 à 33 pour encapsuler au moins une matière active.

20                   38. Utilisation selon la revendication 37, caractérisée en ce que les matières actives sont choisies parmi les peptides, protéines, carbohydrates, acides nucléiques, lipides, ou des molécules organiques ou inorganiques susceptibles d'induire un effet biologique et/ou à activité thérapeutique.

25                   39. Composition pharmaceutique ou de diagnostic caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de matière active un vecteur selon l'une des revendications 17 à 33.

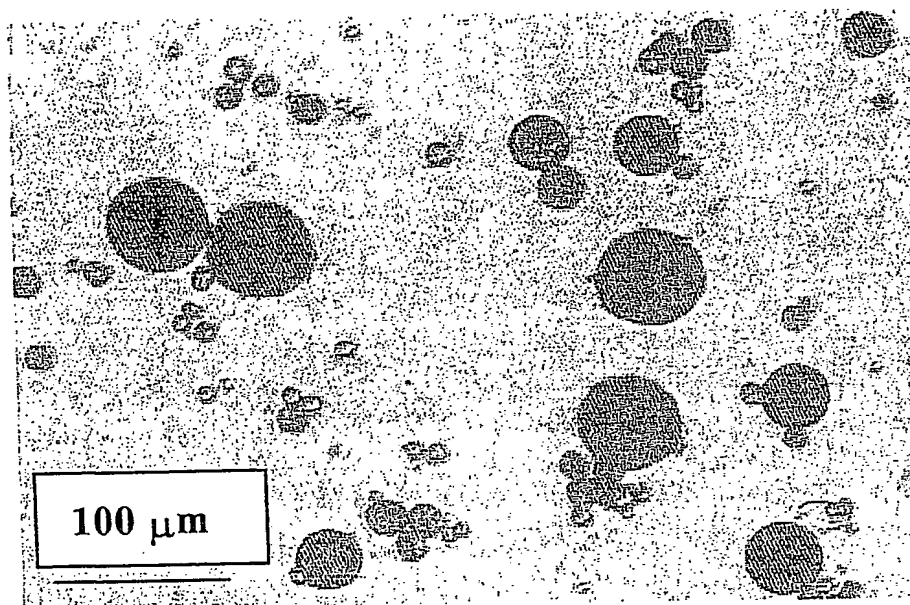
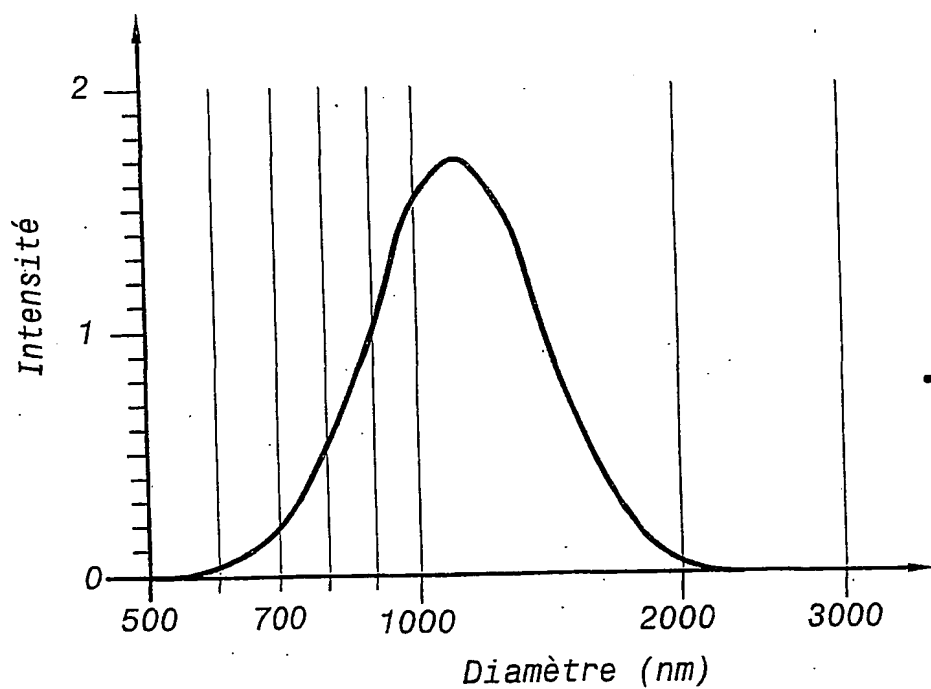
40. Composition de diagnostic caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de matière active un vecteur selon l'une des revendications 17 à 33.

41. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 17  
5 à 33, à titre de vecteurs « furtifs ».

42. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 17 à 33 à titre de vecteurs bioadhésifs.



1/1

**FIG.1****FIG.2**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No

PCT/FR 01/01496

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08G81/00 C08B37/00 C08J3/12 A61K9/14 A61K9/50  
A61K9/51 A61K31/715 G01N33/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08G

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.              |
|------------|--|------------------------------------|
| X          | <p>WO 93 23456 A (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA)<br/>25 November 1993 (1993-11-25)<br/>abstract<br/>page 5, line 25 - line 36<br/>page 11, line 8 - line 31<br/>claims</p> <p style="text-align: center;">---<br/>--/--</p> | <p>1,5-9,<br/>12-16,<br/>18-21</p> |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 August 2001

Date of mailing of the international search report

18/09/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int'l Application No  
 PCT/FR 01/01496

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.               |
|------------|--|-------------------------------------|
| X          | WO 95 03356 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2 February 1995 (1995-02-02)<br><br>page 4, line 1 - line 26<br>page 8, line 4 - line 19<br>page 9, line 8 - line 26<br>page 13, line 20 -page 20, line 16<br>page 23, line 1 -page 24, line 25<br>page 26, line 15 - line 23<br>page 27, line 14 - line 18<br>page 37, line 27 - line 36; example 16            | 1,5-9,<br>11-16,<br>18-33,<br>39-42 |
| Y          | -----<br>WO 97 15389 A (MACROMED INC.)<br>1 May 1997 (1997-05-01)<br>page 15, line 8 -page 17, line 15<br>page 21, line 13 -page 22, line 2; example 1<br>page 26, line 11 - line 22; example 7  | 34-38                               |
| Y          | -----<br>WO 97 15389 A (MACROMED INC.)<br>1 May 1997 (1997-05-01)<br>page 15, line 8 -page 17, line 15<br>page 21, line 13 -page 22, line 2; example 1<br>page 26, line 11 - line 22; example 7  | 34-38                               |
| X          | WO 95 03357 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2 February 1995 (1995-02-02)<br><br>abstract<br>page 7, line 1 -page 8, line 22<br>claims  | 1,5-9,<br>11-16,<br>18-33,<br>39-42 |
| X          | -----<br>US 6 007 845 A (DOMB ET AL.)<br>28 December 1999 (1999-12-28)<br>cited in the application<br><br>abstract<br>figure 2H<br>column 2, line 35 - line 56<br>column 4, line 25 - line 42<br>column 4, line 65 - line 14<br>column 6, line 64 -column 10, line 10<br>column 11, line 30 -column 12, line 12<br>column 12, line 65 -column 13, line 4<br>example 16 | 1,5-9,<br>11-16,<br>18-33,<br>39-42 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR 01/01496

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9323456 A                              | 25-11-1993          | US 5321064 A               | 14-06-1994          |
|   |                     | AT 189824 T                | 15-03-2000          |
|   |                     | AT 198486 T                | 15-01-2001          |
|   |                     | AU 3966393 A               | 13-12-1993          |
|   |                     | CA 2132721 A               | 25-11-1993          |
|   |                     | DE 69327871 D              | 23-03-2000          |
|   |                     | DE 69327871 T              | 26-10-2000          |
|   |                     | DE 69329833 D              | 08-02-2001          |
|   |                     | EP 0640110 A               | 01-03-1995          |
|   |                     | EP 0722971 A               | 24-07-1996          |
|   |                     | JP 7506863 T               | 27-07-1995          |
|   |                     | US 5446078 A               | 29-08-1995          |
|   |                     |                            |                     |
| WO 9503356 A                              | 02-02-1995          | US 5565215 A               | 15-10-1996          |
|   |                     | US 5543158 A               | 06-08-1996          |
|   |                     | US 5578325 A               | 26-11-1996          |
|   |                     | CA 2167920 A               | 02-02-1995          |
|   |                     | CA 2167921 A               | 02-02-1995          |
|   |                     | EP 0710261 A               | 08-05-1996          |
|   |                     | EP 0712421 A               | 22-05-1996          |
|   |                     | JP 9504308 T               | 28-04-1997          |
|   |                     | JP 9504042 T               | 22-04-1997          |
|   |                     | WO 9503357 A               | 02-02-1995          |
| WO 9715389 A                              | 01-05-1997          | US 5665428 A               | 09-09-1997          |
|   |                     | AU 7479796 A               | 15-05-1997          |
|   |                     | CA 2235602 A               | 01-05-1997          |
|   |                     | EP 0857081 A               | 12-08-1998          |
|   |                     | JP 11515016 T              | 21-12-1999          |
| WO 9503357 A                              | 02-02-1995          | US 5543158 A               | 06-08-1996          |
|   |                     | US 5565215 A               | 15-10-1996          |
|   |                     | CA 2167920 A               | 02-02-1995          |
|   |                     | CA 2167921 A               | 02-02-1995          |
|   |                     | EP 0710261 A               | 08-05-1996          |
|   |                     | EP 0712421 A               | 22-05-1996          |
|   |                     | JP 9504308 T               | 28-04-1997          |
|   |                     | JP 9504042 T               | 22-04-1997          |
|   |                     | WO 9503356 A               | 02-02-1995          |
|   |                     | US 5578325 A               | 26-11-1996          |
| US 6007845 A                              | 28-12-1999          | EP 0712421 A               | 22-05-1996          |
|   |                     | JP 9504308 T               | 28-04-1997          |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Derl XXXXXXXXXX Internationale No  
PCT/FR 01/01496

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 C08G81/00 C08B37/00 C08J3/12 A61K9/14 A61K9/50  
A61K9/51 A61K31/715 G01N33/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C08G

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-------------|--|-------------------------------|
| X           | WO 93 23456 A (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA)<br>25 novembre 1993 (1993-11-25)<br>abrégé<br>page 5, ligne 25 - ligne 36<br>page 11, ligne 8 - ligne 31<br>revendications<br><br>---<br><br>-/-- | 1,5-9,<br>12-16,<br>18-21     |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*G\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 août 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/09/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5018 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mazet, J-F

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Derl Internationale No

PCT/FR 01/01496

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |  |  |
|---|--|--|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées                    |
| X   | <p>WO 95 03356 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2 février 1995 (1995-02-02)</p> <p>page 4, ligne 1 - ligne 26<br/> page 8, ligne 4 - ligne 19<br/> page 9, ligne 8 - ligne 26<br/> page 13, ligne 20 -page 20, ligne 16<br/> page 23, ligne 1 -page 24, ligne 25<br/> page 26, ligne 15 - ligne 23<br/> page 27, ligne 14 - ligne 18<br/> page 37, ligne 27 - ligne 36; exemple 16</p>                      | <p>1,5-9,<br/> 11-16,<br/> 18-33,<br/> 39-42</p> |
| Y   | <p>---</p>   | 34-38  |
| Y   | <p>WO 97 15389 A (MACROMED INC.)<br/> 1 mai 1997 (1997-05-01)<br/> page 15, ligne 8 -page 17, ligne 15<br/> page 21, ligne 13 -page 22, ligne 2;<br/> exemple 1<br/> page 26, ligne 11 - ligne 22; exemple 7</p>   | 34-38  |
| X   | <p>WO 95 03357 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2 février 1995 (1995-02-02)</p> <p>abrégé<br/> page 7, ligne 1 -page 8, ligne 22<br/> revendications</p>  | <p>1,5-9,<br/> 11-16,<br/> 18-33,<br/> 39-42</p> |
| X   | <p>US 6 007 845 A (DOMB ET AL.)<br/> 28 décembre 1999 (1999-12-28)<br/> cité dans la demande</p> <p>abrégé<br/> figure 2H<br/> colonne 2, ligne 35 - ligne 56<br/> colonne 4, ligne 25 - ligne 42<br/> colonne 4, ligne 65 - ligne 14<br/> colonne 6, ligne 64 -colonne 10, ligne 10<br/> colonne 11, ligne 30 -colonne 12, ligne 12<br/> colonne 12, ligne 65 -colonne 13, ligne 4<br/> exemple 16</p> <p>-----</p> | <p>1,5-9,<br/> 11-16,<br/> 18-33,<br/> 39-42</p> |

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**  
Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Del. Internationale No  
PCT/FR 01/01496

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| WO 9323456     A                                | 25-11-1993             | US 5321064 A                            | 14-06-1994             |
|   |                        | AT 189824 T                             | 15-03-2000             |
|   |                        | AT 198486 T                             | 15-01-2001             |
|   |                        | AU 3966393 A                            | 13-12-1993             |
|   |                        | CA 2132721 A                            | 25-11-1993             |
|   |                        | DE 69327871 D                           | 23-03-2000             |
|   |                        | DE 69327871 T                           | 26-10-2000             |
|   |                        | DE 69329833 D                           | 08-02-2001             |
|   |                        | EP 0640110 A                            | 01-03-1995             |
|   |                        | EP 0722971 A                            | 24-07-1996             |
|   |                        | JP 7506863 T                            | 27-07-1995             |
|   |                        | US 5446078 A                            | 29-08-1995             |
|   |                        |   |                        |
| WO 9503356     A                                | 02-02-1995             | US 5565215 A                            | 15-10-1996             |
|   |                        | US 5543158 A                            | 06-08-1996             |
|   |                        | US 5578325 A                            | 26-11-1996             |
|   |                        | CA 2167920 A                            | 02-02-1995             |
|   |                        | CA 2167921 A                            | 02-02-1995             |
|   |                        | EP 0710261 A                            | 08-05-1996             |
|   |                        | EP 0712421 A                            | 22-05-1996             |
|   |                        | JP 9504308 T                            | 28-04-1997             |
|   |                        | JP 9504042 T                            | 22-04-1997             |
|   |                        | WO 9503357 A                            | 02-02-1995             |
| WO 9715389     A                                | 01-05-1997             | US 5665428 A                            | 09-09-1997             |
|   |                        | AU 7479796 A                            | 15-05-1997             |
|   |                        | CA 2235602 A                            | 01-05-1997             |
|   |                        | EP 0857081 A                            | 12-08-1998             |
|   |                        | JP 11515016 T                           | 21-12-1999             |
| WO 9503357     A                                | 02-02-1995             | US 5543158 A                            | 06-08-1996             |
|   |                        | US 5565215 A                            | 15-10-1996             |
|   |                        | CA 2167920 A                            | 02-02-1995             |
|   |                        | CA 2167921 A                            | 02-02-1995             |
|   |                        | EP 0710261 A                            | 08-05-1996             |
|   |                        | EP 0712421 A                            | 22-05-1996             |
|   |                        | JP 9504308 T                            | 28-04-1997             |
|   |                        | JP 9504042 T                            | 22-04-1997             |
|   |                        | WO 9503356 A                            | 02-02-1995             |
|   |                        | US 5578325 A                            | 26-11-1996             |
| US 6007845     A                                | 28-12-1999             | EP 0712421 A                            | 22-05-1996             |
|   |                        | JP 9504308 T                            | 28-04-1997             |

**THIS PAGE BLANK (USPTO).**



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**